

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 1 月 29 日 (29.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/008842 A1

- (51) 国際特許分類: A01H 3/04 (ICHIHASHI, Syoichi) [JP/JP]; 〒448-0001 愛知県刈谷市井ヶ谷町広沢1 愛知教育大学内 Aichi (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008799
- (22) 国際出願日: 2003 年 7 月 10 日 (10.07.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2002-213746 2002 年 7 月 23 日 (23.07.2002) JP
- (74) 代理人: 伊東 忠彦 (ITO H, Tadahiko); 〒150-6032 東京都渋谷区恵比寿4丁目20番3号恵比寿ガーデンプレイスタワー32階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CN, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サッポロビール株式会社 (SAPPORO BREWERIES LTD.) [JP/JP]; 〒150-8522 東京都渋谷区恵比寿4丁目20番1号 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 市橋 正一
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF CONSTRUCTING ORCHID HAPLOID BY TREATING UNFERTILIZED ORCHID FLOWER WITH AUXIN AND METHOD OF GROWING ORCHID

(54) 発明の名称: ラン類未受粉花へのオーキシン処理によるラン類の半数体作出方法及びラン類育成方法

(57) Abstract: It is intended to provide a pure line plant which is required in constructing a seed propagation variety of orchid. An aqueous auxin solution is dropped to unfertilized orchid flowers so as to form seeds based on parthenogenesis. Then these seeds are germinated and haploid plants are selected from orchid plants thus grown. The germinating seeds judged as haploid plants are grown to give pure line plants having doubled chromosomes. Thus, a seed propagation variety of orchid is obtained.

(57) 要約: 本発明はラン類種子繁殖品種作出に必要な純系植物を提供する。ラン類未受粉花にオーキシン水溶液を滴下して単為発生に基く種子を形成し、該種子を発芽させて育成したラン類植物から半数体植物を判別し、半数体植物と判別された発芽した種子を育成して染色体の倍化した純系植物となしてラン類の種子繁殖品種とする。

WO 2004/008842 A1

## 明細書

## ラン類未受粉花へのオーキシン処理によるラン類の半数体作出方法及びラン類育成方法

## 5 技術分野

本発明は、ラン類の未受粉花にオーキシンを処理することにより、半数体作出する方法に関する。

## 背景技術

- 10 観賞用の花としてラン類の人気は常に高く、近年ではその需要に応じて大量の栽培が行われている。この高い人気を支えている要因として、消費者の嗜好に合致し、大量の栽培に耐えうる経済性の高いラン類品種が開発され続けていることがあげられる。これらの品種は伝統的な交雑育種によって開発されたものであり、この交雑育種とは交配によって得られた実生集団から優良な個体を選抜するとい
- 15 うものである。得られた優良個体は大量消費に順ずるレベルまで繁殖することが必要であり、大量繁殖法として組織培養によるクローン増殖が利用されている。

- 組織培養によるクローン増殖の技術はいまだ不安定であり、品種による難易、組織培養中の突然変異などの問題がある。これらの問題を回避する為に、品種毎の試験増殖を行う、増殖率を低く抑えるなどの策が採られているが、いずれの方法も突然変異の発生を完全に抑えられるものではなく、組織培養によるクローン
- 20 増殖ラン類では奇形花の発生が確認されている。

- この突然変異は、組織培養中に行われる自然状態では考えられない細胞増殖などで引き起こされるものである。これに対し、過去に行われていた植物の自然な増殖による株分け法などでは、突然変異の発生は非常に少ない。しかしながら、
- 25 株分け法では増殖率が非常に低く、近年の大量消費に対応することは困難である。

一般的には種子を繁殖に利用することにより、突然変異などの問題が無く、高い増殖率が得られる繁殖が行われているが、ラン類植物は雑種性が高いため、種子繁殖集団の均一性に著しい問題が見られる。この種子繁殖集団の均一性を高める一つの方法として、半数体植物を利用した方法がある。

半数体植物はコルヒチン処理などによって遺伝子を倍化させることが可能である。この遺伝子を倍化された植物は純系植物であり、これらの純系植物を自家交配させることにより、均一な種子繁殖集団が得られる。また、純系植物間の交配で得られた雑種第一代 (F1 植物) には、個体間での遺伝的な差が無く、均一な後代を得ることが可能であることから、この雑種第一代からも均一な種子繁殖集団が得られる。

これらの種子繁殖集団は均一であることもさることながら、組織培養によるクローン増殖を経てない為に突然変異の危険性が低く、雑種第一代から得られた種子繁殖集団では雑種強勢などの好ましい付加的特性も期待される。また、組織培養によるクローン増殖においては、同一培養組織から大量の増殖を行うと培養期間が長くなる為、突然変異の危険性も高くなるが、種子繁殖集団では短期間で大量の繁殖が可能となる。

半数体作出法としては、特定植物にしか有効ではないが、薬培養法と種間交雑法が一応確立している。薬培養を利用した半数体作出はタバコ、イネ、コムギなどの育種に利用され、種間交雑法による半数体作出はジャガイモ、大麦などでの育種に利用されているが (小林 仁, 1987, 「新しい植物育種技術」, 養賢堂, 110-112. )、ラン類植物においては、その半数体の作出方法は知られていなかった。

一方、オーキシンは植物成長調節物質 (植物ホルモン) の一種であり、その作用の一つに着果および果実の肥大成長があげられる。オーキシンを処理すると受精しなくても果実が肥大成長する単為結果を起こし、生育を続けることは知られている (倉石晋, 1988, 「植物ホルモン」 (第2版), 東京大学出版会, 45-46. )。この作用はトマト栽培に利用され、トマト未受精花にオーキシンを処理することにより、受粉が行われなくても果実の着生、肥大が行われる。これはオーキシンの作用により、単為発生が誘発され、未受精の子房が発育したものである。しかし、高濃度のオーキシンはエチレン発生を誘導、果実の離脱を促してしまい、適度な処理濃度でないと、未受精子房は落下し、種子を得ることは出来ない。

ランの一種であるシランにエビネ類やシンビジウム類の花粉を交配すると容易に多量の種子が得られる。しかしこれらの種子を播種してみると、その発芽、

- 苗の性状より見て単為生殖の可能性が極めて大きい。これは花粉のホルモンの刺激によって子房が発達し、卵細胞の倍数性単為生殖によるものかあるいは胎座などの母体の栄養組織から胚が由来する無配生殖によって種子を形成するものと考えられている（伊藤五彦・唐沢耕司，1969．「エビネとその仲間」．誠文堂新光社，206-207．）。

- また、ランの一種であるジゴペタラムの柱頭へオーキシンの一種であるナフタレン酢酸を与えることにて、単為生殖を誘導できたと報告されている（森源次郎・山岡浩一・今西英雄，1989．「数種のランにおける単為生殖による種子について」 園芸学会雑誌、第58巻別冊2、森源次郎・山岡浩一・今西英雄，1991．「*Zygopetalum mackayi* の単為生殖による種子形成について」、園芸学会雑誌、第60巻別冊2、466-467）。

#### 発明の開示

- 15 本発明は、ラン類の未受精花へのオーキシン処理により、単為発生に基づく種子形成を行わせ、この種子から半数体植物および純系植物を得ることを目的としている。

以下、本発明を図面を参照して説明する。

図1は一般的なランの花の形態を示す図である。

- 20 図2はフローサイトメーターによる分析結果を示す図である。

図3は顕微鏡による染色体の観察結果を示す図である。

まず、未受精花での種子形成を実現する為に、オーキシン処理を行う。開花日から開花30日後までの間に処理を行うのが適当である。

- 25 処理部位として、ずい柱もしくはずい柱を含む部分にオーキシン水溶液をスプレー、塗布もしくは滴下する。なお、図1に一般的なランの花の形態図を示す（内田一仁，1982．洋蘭 The Orchid. 講談社. 99. より）。

ラン類の種類や開花状況によっては花が下を向いていることがあり、オーキシン水溶液が重力によって落下してしまうのを防ぐ為に、寒天やでんぷんなどを水溶液に混入し加熱により粘性を高めること、あるいはラノリン懸濁しペースト化

することなどにより、処理部位にオーキシシンが留まるようにすることも有効である。

オーキシシン水溶液のオーキシシン濃度は0.1～5.0%とする。

オーキシシンとして、インドール酢酸 (IAA)、4-クロロインドール酢酸、フェニル酢酸、2,4ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)、 $\alpha$ -ナフタレン酢酸 (NAA) 5、2,6ジクロロ安息香酸、インドール酪酸 (IBA)、4-クロロフェノキシ酢酸、5-クロロインタゾール酢酸エチル、2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸を利用可能である。

10 処理直後から花被片のしおれが見られるようになり、1週間程度で子房の肥大が確認される。

子房の発育および種子形成はラン類植物の種類によって異なるが、処理後2ヶ月から6ヶ月で種子の熟成が観察される。この間、種子の落下に十分注意する必要がある。また、通常の交配、結実比べ、1ヶ月から2ヶ月ほど早めに種子が熟することもある。

15 熟した種子を採取し、無菌状態で播種を行う。播種は慣行法に則り行う。種子の発芽率は通常の交配種子に比べ低くなる。

発芽が見られ、一定の大きさに生育したら、速やかに半数体植物であるかどうかを確認する。半数体植物であることの確認は、発芽個体の組織の一部を取り出し、染色体の数もしくはDNA含量を測定し、これらの値を自家受粉由来植物と比較することにより行う。20 発芽から一定の期間を経過した後では、半数体植物の染色体数が自然に倍化している可能性がある為、半数体植物の確認は発芽から1～5ヶ月以内に行う必要がある。

発明を実施するための最の形態

25 以下、本発明の実施の形態として一実施例を説明する。

実施例としてシラン *Bletilla. Brigantes* 'H5-11' を用いた。供試株は慣行法で育成されたものである。開花を確認し花粉を取り除き、 $\alpha$ -ナフタレン酢酸を2%含む温めたラノリンペーストをスポイトを用いて10 $\mu$ l ずつ柱に滴下処理した。同一個体に複数の花が着生する為、上記の処理を各個体について5反復以上

行った。

子房が肥大したものは完全に熟してから（処理から6～7ヶ月後）採取し、0.5%次亜塩素酸溶液で5分間表面殺菌をし、無菌容器中に播種し発芽を促した。

播種後、播種した種子数および有胚種子数を観察したところ、全播種種子数7,037

5 に対して、有胚種子11個を確認した。

表1に播種に使用した培地組成を示す。

[表1]

実施例における無菌播種で用いた培地成分表

Hyponex (6.5:6.0:19.0)	3 g/l
ショ糖	20 g/l
寒天	10 g/l

10

播種から2週間後、これらの有胚種子からオーキシン処理由来植物8個体の発芽が確認された。

オーキシン処理由来植物がサンプリングに適当な大きさに生育した後（発芽から1～2ヶ月後）、フローサイトメーターを用いてこれらオーキシン処理由来植物のDNA含量を測定し、同時に染色体を観察して染色体数を調査した。

調査は実生苗の幼葉を採取して行い、本発明による $\alpha$ -ナフタレン酢酸（NAA）処理したものと、比較のため自家受粉由来の植物について実施した。図2はフローサイトメーターによる分析結果を示し、図3は顕微鏡による染色体の観察結果を示す。図2に示すように、フローサイトメトリー機器を用いたDNA含量調査においては、自家受粉由来植物で見られたピークに対して、オーキシン処理由来植物では約半分の位置にピークが見られた。

20

染色体の観察においては、図3に示すように、オーキシン処理由来植物の染色

体が16本であることが観察され、これはシランの染色体数32本の半分であることが確認された。

発芽から5~6ヶ月後、オーキシン処理由来植物のDNA含量を再度フローサイトメーターで測定したところ、そのピークは自家受粉由来植物とほぼ同じ位置に  
5 確認されたため、発芽2~5ヶ月後の間にオーキシン由来植物の染色体数が自然に倍化していることが確認された。

これらの観察結果から、オーキシン処理由来植物が半数体であることが確認された。また、これらのオーキシン処理由来植物はその後の時間経過に従い、染色体数が自然に倍化することが同時に観察され、発芽から2ヶ月以内に染色体数を  
10 確認することが必要であることが確認された。

すでに述べたように、本発明によるラン類の半数体育成は、ラン類の種子繁殖品種作出に必要な純系植物の提供を可能とするものであり、このことにより、突然変異などの危険性の低い、安定した優良品種の提供が長期にわたり可能となる。

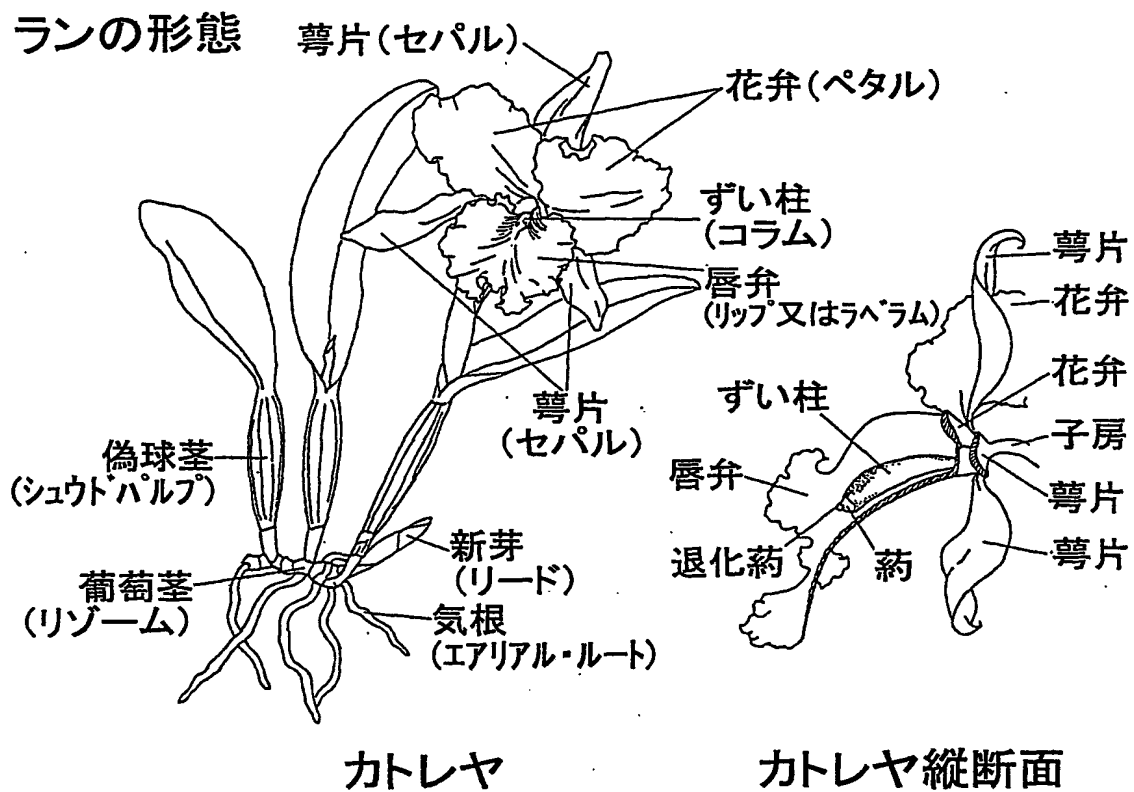
## 請求の範囲

1. ラン類未受粉花にオーキシシン水溶液を滴下して単為発生に基く種子を形成し、該種子を発芽させて生育して半数体植物のラン類を得ることを特徴とするラン類の半数体作出方法。
- 5 2. ラン類の開花日から開花30日後までの間の期間にラン類未受粉花へのオーキシシン水溶液の滴下を行うことを特徴とする請求項1に記載のラン類の半数体作出方法。
3. オーキシシン溶液は未受粉花のずい柱又はずい柱を含む部位に滴下することを特徴とする請求項1に記載のラン類の半数体作出方法。
- 10 4. オーキシシン溶液の濃度を0.1%～5.0%である請求項1に記載のラン類の半数体作出方法。
5. オーキシシン水溶液は、インドール酢酸 (IAA)、4-クロロインドール酢酸、フェニル酢酸、2,4ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)、 $\alpha$ -ナフタレン酢酸 (NAA)、2,6ジクロロ安息香酸、インドール酪酸 (IBA)、4-クロロフェノキシ酢酸、
- 15 5-クロロインタゾール酢酸エチル及び2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸からなる群より選択される水溶液である請求項1に記載のラン類の半数体作出方法。
6. ラン類未受粉花にオーキシシン水溶液を滴下して単為発生に基く種子を形成し、該種子を発芽させて育成したラン類植物から半数体植物を判別し、半数体植物と判別された発芽した種子を育成してラン類の種子繁殖品種とするラン類の種子繁殖品種生産方法。
- 20 7. 半数体植物の判別は、発芽後1～5ヶ月の期間において採取した試料のDNA含量又は染色体数を測定することにより行うことを特徴とする請求項6に記載のラン類の種子繁殖品種とするラン類の種子繁殖品種生産方法。



1/3

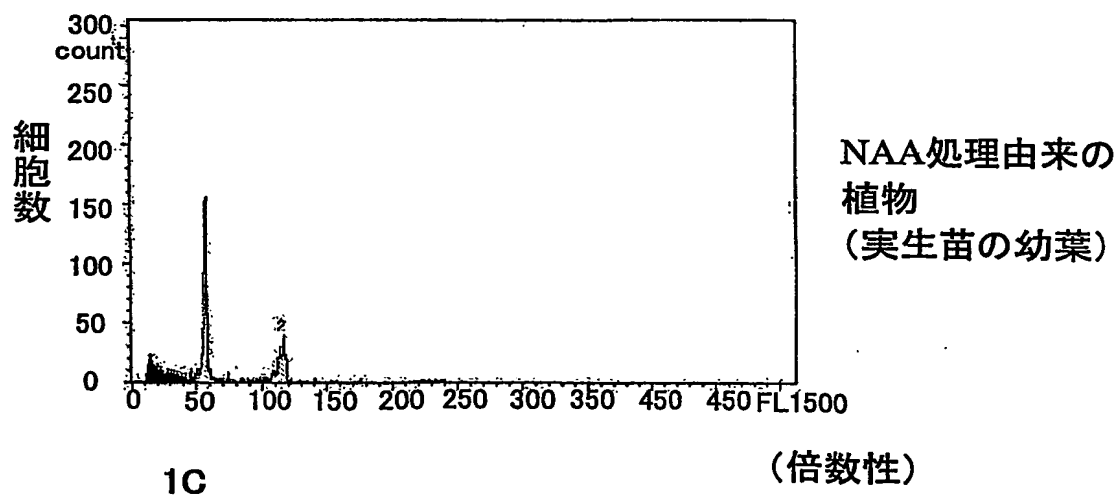
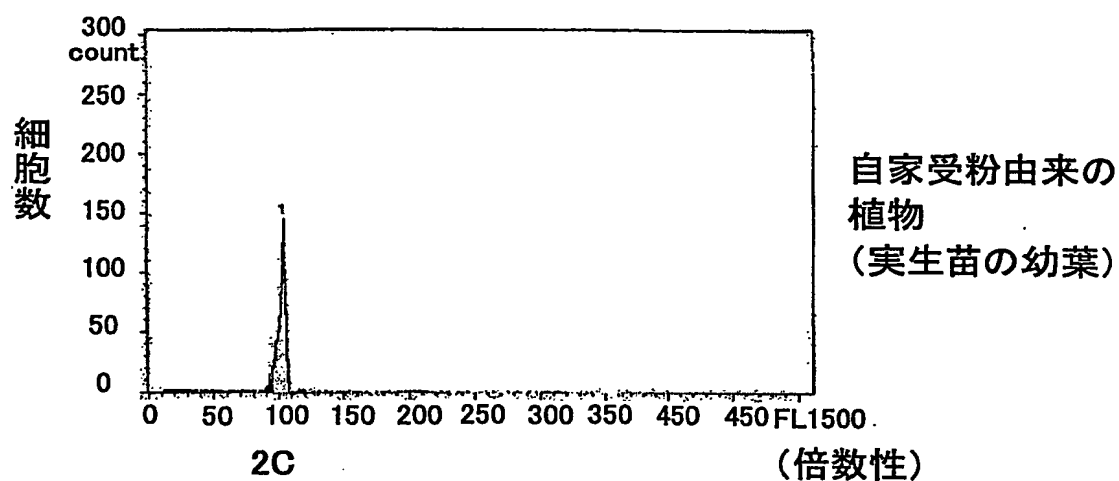
FIG.1



2/3

## FIG.2

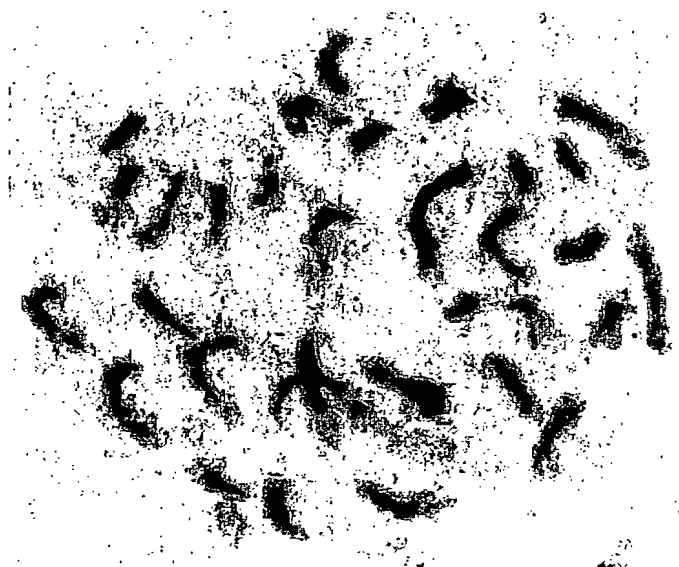
フローサイトメーターによる分析結果



3/3

# FIG.3

染色体觀察結果



自家受粉由来植物  $2n=32$  (根端)



NAA处理由来植物  $n=16$  (根端)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08799

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> A01H3/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> A01H3/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Yuji ITO et al., "Bletilla Brigantes no Chuto NAA Shori ni yori Sakushutsu Sareta Hansutai", Journal of the Horticultural Association of Japan, Vol.71, No.2, (2002, October), page 402	1-7
A	Seiichi ICHIHASHI et al., "Flow Cytometer ni yoru Ran-ka Shokubutsu no Baisu-sei Chosa", Aichi University of Education Kenkyu Hokoku, Vol.50, (2001), pages 39 to 45	1-7
A	Campion, B. et al., Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion ( <i>Allium cepa</i> L.), Plant Breed, Vol.114, No.3, (1995), pages 243 to 246	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
10 September, 2003 (10.09.03)Date of mailing of the international search report  
30 September, 2003 (30.09.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A01H3/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A01H3/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	伊藤祐司ら, Bletilla Brigantesの柱頭NAA処理により作出された半数体, 園芸学会雑誌, 第71巻, 第2号 (2002, Oct.) p. 402	1-7
A	市橋正一ら, フローサイトメーターによるラン科植物の倍数性調査, 愛知教育大学研究報告, 第50巻 (2001) p. 39-45	1-7
A	Campion, B. et al., Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion ( <i>Allium cepa</i> L.), Plant Breeding, Vol. 114, No. 3 (1995) pp. 243-246	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.09.03

国際調査報告の発送日

30.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進



4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488